

МРНТИ: 34.25.29

А.Р. ӘБДИМҰХТАР*, Г.Д. НАХАНОВА, Ж.К. КОШЕМЕТОВ, Б.К. УМИРАЛИЕВ,
Н.К. ОРАЗЫМБЕТОВА, Ш.С. ТҰРЫСКЕЛДІ, С.Ш. НУРАБАЕВ

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
пгт. Гвардейский, Казахстан

*e-mail: azamat_95.96@mail.ru

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.06

Аннотация

Вирус чумы плотоядных является высококонтагиозным патогеном, который характеризуется лихорадкой, пневмонией, воспалением слизистых оболочек, лейкопенией и поражением центральной нервной системы, приводящей часто к летальному исходу. К этой болезни восприимчивы все собаки, независимо от породы, норки, песцы, волки, лисицы, тюлени, тигры и т.д. В последние годы межвидовые инфекции чумы плотоядных наблюдались у нечеловекообразных приматов, включая выведенных и диких макак-резусов и яванских макак. Смертность от чумы плотоядных у макак-резусов достигает 5–30%. Несмотря на почти столетнюю историю борьбы с этой инфекцией остаются актуальными вопросы диагностики, профилактики и специфического лечения. Учитывая важность этой проблемы, для разработки диагностических или профилактических средств необходимо наработать высокоактивную вирусную биомассу. В связи с этим, наши исследования посвящены изучению культуральных свойств и определению оптимальных условий культивирования вируса чумы плотоядных.

В результате исследований наиболее оптимальной для размножения вируса чумы плотоядных нами выбрана культура клеток Vero. При этом ЦПД вируса развивается через 48–56 часов с титром вируса $6,25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. Также определены оптимальные параметры культивирования вируса чумы плотоядных в культуре клеток Vero.

Ключевые слова: чума плотоядных, культура клеток, культивирование, адаптация вируса.

Чума плотоядных – высококонтагиозное повсеместно распространённое заболевание, сопровождающееся высокой температурой, воспалением слизистых оболочек органов дыхания и зрения, и поражением центральной нервной системы [1]. Чума известна со времён одомашнивания собак. Возбудитель чумы плотоядных - РНК-содержащий вирус, имеющий на своей поверхности два белка-антигена Н и F. Вирус чумы плотоядных входит в семейство *Paramyxoviridae*, род *Morbillivirus*. К этой же группе относится вирус кори человека, чумы крупного рогатого скота и возбудители ряда других болезней [2, 3].

Важно отметить, что недавно возникли вспышки чумы плотоядных с высокой смертностью среди нечеловекообразных приматов. Крупная вспышка чумы плотоядных произошла у макак-резусов на племенной ферме в провинции Гуанси в 2006 г., за которой последовала еще одна вспышка у макак-резусов в Центре животных в Пекине в 2008г. Смертность от чумы плотоядных у макак-резусов достигает 5–30%. В связи с этим, в будущем есть вероятность передачи вируса от животных к человеку [4, 5].

Чума плотоядных может протекать молниеносно, сверхостро, остро, подостро, абортивно, типично и атипично. По клиническим признакам различают катаральную, лёгочную, кишечную, кожную, нервную и смешанную (генерализованную) формы болезни. Развитие той или иной формы чумы определяется реактивностью организма животного. Один и тот же штамм возбудителя может вызывать у животных разнотипные клинические признаки [6].

Несмотря на почти столетнюю историю борьбы с этой инфекцией, остаются актуальными вопросы диагностики, профилактики и специфического лечения. Для

разработки диагностических и профилактических средств необходимо наработать высокоактивную вирусную биомассу. Современные требования, предъявляемые к эффективности и безопасности ветеринарных препаратов, а также их качественного производства с соблюдением правил GMP, приводят к совершенствованию технологий изготовления вакцинных препаратов, создание которых сводится к культивированию вакцинных штаммов различных вирусов в перевиваемой клеточной линии. Определение оптимальных условий культивирования вируса является важнейшей характеристикой вирусодержащей суспензии, пригодной для изготовления средств специфической профилактики. Получение вируса с наибольшей биологической и антигенной активностью позволяет разрабатывать противовирусные препараты с высокой иммуногенной активностью. Исходя из этого, целью данного исследования является выбор оптимальной системы культивирования вируса чумы плотоядных.

Материалы и методы

Штаммы вирусов. В работе использовали штаммы «ЛД» и «Вакчум» вируса чумы плотоядных.

Выбор оптимальной системы культивирования вируса чумы плотоядных. По данным многочисленных исследователей для культивирования вируса чумы плотоядных используются как первичные, так и перевиваемые клеточные культуры [9, 10].

Адаптацию вируса чумы плотоядных к культуре клеток проводили с использованием следующих клеточных линий: первично-трипсинизированных – ПТ и ПЯ, а также перевиваемых линий культур клеток – Vero, ВНК-21, СПЭВ, IB-RS-2 и ПО, выращенных в пробирках. Для адаптации штамма «ЛД» и «Вакчум» вируса чумы плотоядных к линии клеток проведено 6 последовательных пассажей вируса на вышеперечисленных культурах.

Для изучения влияния качества поддерживающей питательной среды на размножение вируса чумы плотоядных нами были испытаны имеющиеся в НИИПББ питательные среды ПСП, ДМЭМ и Игла. С целью определения влияния концентрации сыворотки на размножение вируса чумы плотоядных в культурах клеток были испытаны 1, 2, 5 и 10% концентрации фетальной сыворотки телят в поддерживающей среде.

Определение биологической активности штамма вируса чумы плотоядных в испытанных системах культивирования. Для определения оптимальной заражающей дозы вируса чумы плотоядных, при которой происходит наибольшее его накопление, были испытаны дозы вируса от 0,01 до 1 ТЦД₅₀/кл. По достижению цитопатического действия в монослое культуры клеток на 85–90% матрасы подвергались двум циклам замораживания-оттаивания в пределах от минус 40 °С до комнатной температуры. Сбор вирусодержащих материалов (ВСМ) каждого пассажа проводился в асептических условиях в стерильные флаконы. Одновременно из каждого флакона с ВСМ отбирались пробы для определения биологической активности вируса в соответствии с методом. Титр вируса был рассчитан с использованием метода Reed I.J. и Muench H. А и были указаны в lg ТЦД₅₀/см³ [7]. Стерильность ВСМ каждого пассажа определена согласно ГОСТ 28085–2013 [8].

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с вычислением среднего арифметического значения (X) и средней квадратической ошибки (m) при помощи компьютерной программы "Microsoft Excel" и GraphPad Prism версии 8.0.1. Цифровые данные подвергали статистическому анализу с определением средних величин и их ошибок непосредственным и разностным методом по Стьюденту.

Результаты и обсуждение

Выбор оптимальной системы культивирования вируса чумы плотоядных

С использованием вышеперечисленных культур клеток проведено по 6 последовательных пассажей. Результаты этих исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Адаптация вируса к различным культурам клеток

Наименование культуры клеток	Вирус/штамм	Пассажный уровень					
		1	2	3	4	5	6
ПЯ	ЧП «ЛД»	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
ПТ	ЧП «ЛД»	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
Vero	ЧП «ЛД»	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
ВНК-21	ЧП «ЛД»	- - - -	+ - - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
СПЭВ	ЧП «ЛД»	- - - -	- - - -	- - + +	- + + +	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	- - - -	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
IB-RS-2	ЧП «ЛД»	- - - -	- - - -	+ - - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	- - - -	- - - -	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +
ПО	ЧП «ЛД»	- - - -	- - - -	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	- - - -	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
Примечания: 1 «+ - - -» – появления ЦПД на 25%; 2 «+ + - -» – появления ЦПД на 50%; 3 «+ + + -» – появления ЦПД на 75%; 4 «+ + + +» – появления ЦПД на 100%; 5 «- - - -» – отсутствие ЦПД.							

Как видно из результатов таблицы 1, вирус чумы плотоядных адаптируется к культурам клеток ПТ, ПЯ, Vero, ВНК-21 и СПЭВ на 3 пассажном уровне. Более длительная, на 4 пассажном уровне, адаптация была к культурам клеток перевиваемой линии IB-RS-2 и ПО.

В культурах клеток ПЯ, ПТ, Vero и ВНК-21 ЦПД вируса развивалось через 48–56 час после заражения, деструкция монослоя и его отслоение от стекла наблюдались через 72 часа. В культурах клеток СПЭВ IB-RS-2 и ПО ЦПД вируса развивалось через 72 часа. Размножение вируса сопровождалось вначале очаговым, а позднее, после 96 часов, почти полным разрушением клеточного монослоя.

Таким образом, проведенные исследования показали, что все испытанные культуры клеток чувствительны к вирусу чумы плотоядных. Следует отметить, что более четко выраженное и раннее ЦПД вируса чумы плотоядных наблюдается в культуры клеток ПЯ и Vero. Отмечено также, что удовлетворительными характеристиками обладают культуры клеток ПТ и СПЭВ.

Отработка оптимальных параметров получения активного вируссодержащего материала в выбранных системах культивирования.

Результаты по определению биологической активности штамма вируса в испытанных системах культивирования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Биологическая активность вируса чумы плотоядных, в различных культурах клеток

Наименование культуры клеток	Количество опытов	Биологическая активность вирусов в культуре клеток, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (M±m)	
		Штамм «ЛД»	Штамм «Вакчум»
ПЯ	3	5,75±0,11	5,31±0,08
ПТ	3	5,00±0,14	4,73±0,12
Vero	3	6,25±0,11	5,75±0,12
ВНК-21	3	5,0±0,07	4,77±0,11
СПЭВ	3	4,5±0,10	4,43±0,09
ПО	3	4,03±0,09	3,77±0,11

Из данных, представленных в таблице 2, следует, что наиболее приемлемой культурой клеток для определения биологической активности является культуры клеток ПЯ и Vero. При этом биологическая активность вируса составляет 5,75–6,25 lg ТЦД₅₀/см³, соответственно.

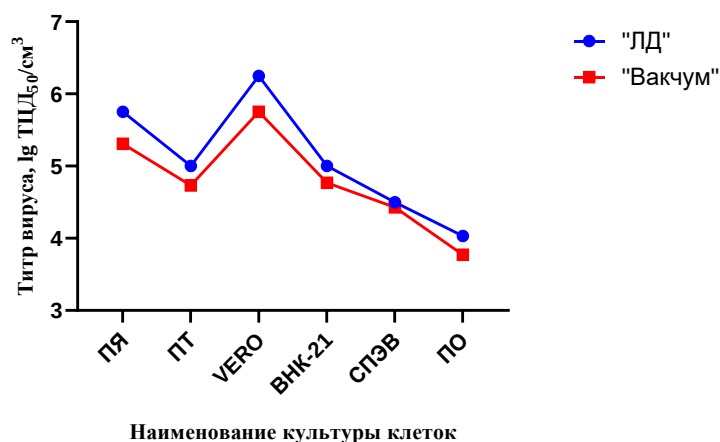


Рисунок 1 - Биологическая активность вируса чумы плотоядных в различных культурах клеток

Для определения оптимальной заражающей дозы вируса чумы плотоядных, при которой происходит наибольшее его накопление, нами были испытаны дозы вируса от 0,01 до 1 ТЦД₅₀/кл., которыми заражали культуру клеток Vero. Сбор вирусного сырья производили через 72–96 часов после заражения. Биологическую активность вирусного материала определяли путем титрования проб в культуре клеток Vero.

В результате проведения этих исследований установлено, что наибольшее накопление вируса чумы плотоядных в культуре клеток (6,25 lg ТЦД₅₀/см³) происходит при заражающей дозе 0,1–0,5 ТЦД₅₀/кл., а оптимальным сроком сбора вирусного материала является 96 часов.

Для изучения влияния качества поддерживающей питательной среды на размножение вируса чумы плотоядных испытаны имеющиеся в НИИПББ питательные среды: ПСП, ДМЭМ и Игла. В результате проведенных исследований установлено, что питательная среда Игла и ПСП через 48–72 часов снижала свое рН и вызывала резкое замедление размножения вируса и омертвление монослоя клеток. Среда ДМЭМ на протяжении 8–10 суток не оказывала влияние на монослой клеток и способствовала размножению вируса чумы плотоядных в испытанных культурах клеток через 72–96 часов. ЦПД вируса на культуре клеток Vero представлено на рисунке 2.

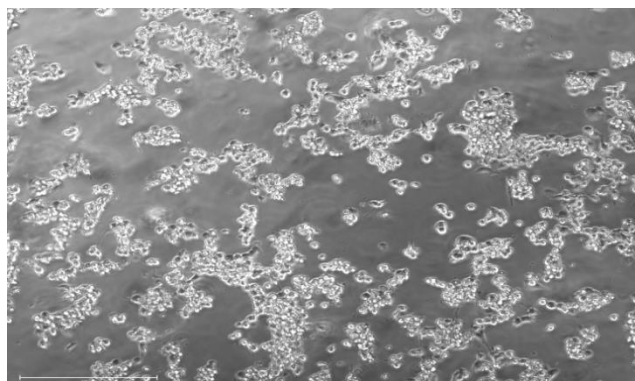


Рисунок 2 – Цитопатическое действие вируса чумы плотоядных в культуре клеток Vero (ув. x 100).

С целью определения влияния концентрации сыворотки на размножение вируса чумы плотоядных в культурах клеток испытаны 1, 2, 5 и 10% концентрации фетальной сыворотки телят в поддерживающей среде. В результате проведенных исследований установлено, что 1 % содержание сыворотки не способствовало быстрому накоплению вируса, ЦПД вируса было слабое, деструкции монослоя не наступало. В дальнейших исследованиях было определено, что оптимальной оказалась 2 % концентрация сыворотки.

Вирусные болезни плотоядных причиняют значительный ущерб пушному звероводству, домашнему и служебному собаководству. Наиболее опасным из них является чума плотоядных. Первые вспышки этих болезней появились в Азии 3000 лет назад, а затем распространились на Ближний Восток, а затем в Европу. В России чуму собак впервые зарегистрировали в 1762 г. в Крыму и назвали её "крымская болезнь", затем в 1770 г. её обнаружили в Москве [9]. На территории Республики Казахстан чума плотоядных встречается повсеместно. Анализ литературы показывает, что данное заболевание в стране в разные годы регистрировали среди собак различных пород, норок, тхорзофредок, песцов, лис и тюленей. [10, 11].

Вирус чумы плотоядных может быть адаптирован к куриным эмбрионам и культивироваться в них при заражении на хорионаллантоисную оболочку. В оболочке появляются сероватые фокусы и тяжи, в результате эмбрионы гибнут. Заражение эмбрионов внесением вирусосодержащего материала в желточный мешок ведёт к гибели их на 7-11-е сутки после заражения [12]. Из литературных данных известно, что вирус чумы плотоядных активно размножается в первичных культурах клеток почки и легких собак, хорьков, слизистой оболочки мочевого пузыря собак, а адаптированные штаммы - в клетках куриного эмбриона и в перевиваемых клетках - MDBC, Vero и др [13]. Цитопатическое действие вируса проявляется образованием синцития через 7–14 дней после заражения монослоя [14]. Вирус после адаптации возможно культивировать на 3–6-месячных хорьках и 6–12-месячных щенках собак.

По результатам наших исследований вирус чумы плотоядных адаптирован к культурам клеток ПТ, ПЯ, Vero, ПП, ВНК-21, СПЭВ, IB-RS-2, ПО, начиная с 3-го пассажного уровня, вызывает ЦПД через 48–72 часов. Наиболее оптимальной системой для размножения вируса чумы плотоядных нами признана культура клеток Vero. ЦПД вируса развивается через 48–56 часов, титр вируса составил $6,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Определены основные параметры (заражающая доза, концентрация сыворотки, питательная среда) культивирования вируса чумы плотоядных в культуре клеток Vero, позволяющие получать активную вирусосодержащую суспензию.

Заключение

В результате проведенных исследований определены оптимальные системы культивирования вируса чумы плотоядных на культурах клеток и установлены основные параметры, позволяющие получать вирусосодержащую суспензию вируса, пригодную в технологии изготовления специфических антигенов. Полученные нами результаты совпадают с литературными данными и дополняет информацию об оптимальных условиях культивирования вируса чумы плотоядных.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания «Услуги по обеспечению биологической безопасности в сфере науки» по целевому финансированию на 2022 год при поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

Литература:

1 Бакулин В.А., Каштанова Д.В. Чума плотоядных // Ветеринарная клиника. - 2014. - №10. - С. 15 - 17.

2 Baumgartner W., Alldinger S., Beineke A., Groters S., et al. Canine distemper virus an agent looking for new hosts. German. – 2003. – Vol. 110. – P. 137-42. PMID: 12756952.

3 Воробьева А. А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М.: Медицинское информационное агентство. – 2003. – 236 с.

4 Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. J Virol. – 2013. – Vol. 87. – P. 1105-1114. doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02419-12>. . Epub 2012 Nov 7. PMID: 23135729.

5 Qiu W, Zheng Y, Zhang S, Fan Q, Liu H, Zhang F, Wang W, Liao G, Hu R. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. Emerg Infect Dis. – 2011. – Vol. 17. – P. 1541-1543. doi: 10.3201/eid1708.101153. PMID: 21801646; PMCID: PMC3381540.

6 Cleaveland S., Appel M.G., Chalmers W.S., Chillingworth C., Kaare M., Dye C. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. Vet. Microbiol. - 2000. — P. 217–227.

7 Reed I.J., Muench H.A. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *American Journal of Hygiene*. – 1938. – 27. – P.493 – 497.

8 ГОСТ 28085-2013 Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Методы контроля стерильности.

9 Gilbert M., Soutyrina S.V., Seryodkin I.V., Sulikhan N., Uphyrkina O.V., Goncharuk M., Matthews L., Cleaveland S., Miquelle D.G. Canine distemper virus as a threat to wild tigers in Russia and across their range. Integr Zool. - 2015. – Vol. 10. – P. 329-343. doi: 10.1111/1749-4877.12137. PMID: 25939829.

10 Кошметов Ж.К., Кыдырбаев Ж.К., Султанкулова К.Т. и др. Чума плотоядных угрожает редким животным. // *Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности*. - 2014. – С.131-135.

11 Орынбаев М. Б., Белоусов В. Ю., Султанкулова К. Т., Строчков В. М., Керимбаев А. А. Секвенирование и филогенетический анализ р- и h-генов штаммов вируса чумы плотоядных, выделенных на территории Казахстана. // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. - 2011. - № 3 (11). - С. 11-17.

12 Бронникова Т.М. Характеристика вируса чумы плотоядных. IX Межд. Студенческая научная конференция. Сочи – 2017.

13 Сюрин В.Н. Частная ветеринарная вирусология: учеб. Пособие / В.Н. Сюрин, Н. В. Фомина – М.: Колос. - 1979. – 472 с.

14 Martinez-Gutierrez M, Ruiz-Saenz J. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. BMC Vet Res. - 2016. P. 120-126. doi: 10.1186/s12917-016-0702-z.

А.Р. ӘБДІМҰХТАР*, Г.Д. НАХАНОВА, Ж.К. КОШЕМЕТОВ, Б.К. УМИРАЛИЕВ,
Н.К. ОРАЗЫМБЕТОВА, Ш.С. ТҰРЫСКЕЛДІ, С.Ш. НУРАБАЕВ

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, Гвардейск күк,
Қазақстан

* e-mail: azamat_95.96@mail.ru

ЕТ ҚОРЕКТІЛЕР ОБАСЫ ВИРУСЫН ӨСІРУДІҢ ОҢТАЙЛЫ ЖҮЙЕСІН ТАҢДАУ

Түйін

Ет қоректілер обасы вирусы – қызба, пневмония, шырышты қабықтың қабынуы, лейкопения және орталық жүйке жүйесінің зақымдануымен сипатталатын өте жұқпалы патоген. Бұл аурудың соңы көбінесе өліммен аяқталады. Бұл ауруға барлық иттердің түрлері, күзен, арктикалық түлкі, қасқыр, түлкі, итбалық, жолбарыс және т.б. етқоректілердің барлығы бейім болып келеді. Соңғы жылдары приматтарда, оның ішінде асыл тұқымды және жабайы резус маймылдары мен яван макакаларында ет қоректілер обасы түр аралық инфекция түрінде байқалды. Резус

маймылдарындағы өлім көрсеткіші 5-30% жетті. Бұл вируспен күресудің ғасырға жуық тарихына қарамастан, диагностика, алдын алу және нақты емдеу мәселелері өзекті болып қала береді. Бұл мәселенің маңыздылығын ескере отырып, диагностикалық немесе профилактикалық препараттарды жасау үшін жоғары белсенді вирустық биомассаны жасау қажеттілігі жоғары болып табылады. Осыған байланысты, біздің зерттеулеріміз ет қоректілер обасы вирусының жасуша өсіндісінде өсу ерекшеліктерін анықтауға және оңтайлы өсіру жүйесін таңдауға арналды. Зерттеу нәтижесінде Vero жасуша өсіндісі ет қоректілер обасы вирусын өсіру үшін ең оңтайлы деп танылды. Вирустың ЦПӨ 48-56 сағатта дамиды, вирус титрі $6,25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ құрады. Сонымен қатар Vero жасуша өсіндісінде ет қоректілер обасы вирусын өсірудің негізгі параметрлері анықталды.

Кілтті сөздер: ет қоректілер обасы, жасуша өсіндісі, вирусты өсіру, вирустың бейімделуі.

IRSTI: 34.25.29

A.R. ABDIMUKHTAR*, G.D. NAHANOVA, Zh.K. KOSHEMETOV,
B.K. UMIRALIYEV, N.K. ORAZYMBETOVA, Sh.S. TURYSKELDI,
S.Sh. NURABAEV

Scientific Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy uts, Kazakhstan

* e-mail: azamat_95.96@mail.ru

SELECTION OF THE OPTIMAL SYSTEM OF CULTIVATION OF CARNIVOROUS DISPEST VIRUS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.06

Abstract

Canine distemper virus is a highly contagious pathogen characterized by fever, pneumonia, mucosal inflammation, leukopenia, and central nervous system involvement. This often leads to the death of carnivores. All dogs, regardless of breed, are susceptible to this disease, minks, arctic foxes, wolves, foxes, seals, tigers, etc. In recent years, interspecific infections of canine distemper have been observed in non-human primates, including bred and wild rhesus monkeys and cynomolgus monkeys. Mortality from canine distemper in rhesus monkeys reaches 5–30%. Despite almost a century of history of the fight against this infection, the issues of diagnosis, prevention and specific treatment remain relevant. Considering the importance of this problem, it is necessary to develop a highly active viral biomass in order to develop diagnostic or prophylactic agents. In this regard, our studies were devoted to studying the cultural properties and determining the optimal conditions for the cultivation of canine distemper virus.

As a result of research, we have recognized the Vero cell culture as the most optimal for the propagation of canine distemper virus. Cytopathic effect of the virus develops in 48-56 hours, the virus titer was $6.25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. The main parameters of canine distemper virus cultivation in Vero cell culture were also determined.

Keywords: canine distemper, cell culture, cultivation, virus adaptation.

Plague of carnivores is a highly contagious, ubiquitous disease accompanied by high fever, inflammation of the mucous membranes of the respiratory and visual organs, and damage to the central nervous system [1]. The plague has been known since the domestication of dogs. The causative agent of carnivorous plague is an RNA-containing virus that has two proteins on its surface-antigens H and F. The carnivorous plague virus is a member of the *Paramyxoviridae* family, the genus *Morbillivirus*. The human measles virus, cattle plague and pathogens of a number of other diseases belong to the same group [2, 3].

It is important to note that recently there have been outbreaks of carnivorous plague with high mortality among non-human primates. A major outbreak of carnivorous plague occurred in rhesus monkeys on a breeding farm in Guangxi Province in 2006, followed by another outbreak in rhesus monkeys at the animal Center in Beijing in 2008. Mortality from carnivorous plague in

rhesus monkeys reaches 5-30%. In this regard, there is a possibility of transmission of the virus from animals to humans in the future [4, 5].

Carnivorous plague can occur at lightning speed, hyperacute, acute, subacute, abortive, typical and atypical. According to clinical signs, there are catarrhal, pulmonary, intestinal, cutaneous, nervous and mixed (generalized) forms of the disease. The development of a particular form of plague is determined by the reactivity of the animal's body. The same strain of the pathogen can cause different types of clinical signs in animals [6].

Despite the almost century-old history of the fight against this infection, the issues of diagnosis, prevention and specific treatment remain relevant. To develop diagnostic and preventive means, it is necessary to develop a highly active viral biomass. Modern requirements for the effectiveness and safety of veterinary drugs, as well as their high-quality production in compliance with GMP rules, lead to the improvement of technologies for the manufacture of vaccine preparations, the production of which is reduced to the cultivation of vaccine strains of various viruses in a transferable cell line. Determination of optimal conditions for virus cultivation is the most important characteristic of a virus-containing suspension suitable for the manufacture of specific prophylaxis. Obtaining a virus with the greatest biological and antigenic activity allows the development of antiviral drugs with high immunogenic activity. Based on this, the purpose of this study is to select the optimal system for cultivating the carnivorous plague virus.

Materials and methods

Virus strains. The strains "LD" and "Vacchum" of the carnivorous plague virus were used in the work.

Choosing the optimal system for cultivating the carnivorous plague virus. According to numerous researchers, both primary and transferable cell cultures are used for the cultivation of the carnivorous plague virus [9, 10].

Adaptation of the carnivorous plague virus to cell culture was carried out using the following cell lines: primary-trypsinized – lamb kidney and calf kidney, as well as transplanted cell culture lines – Vero, BHK-21, kidney of a pig embryo, IB-RS-2 and sheep kidney grown in test tubes. To adapt the strain "LD" and "Vacchum" of the carnivorous plague virus to the cell line, 6 consecutive passages of the virus were carried out on the above cultures.

To study the effect of the quality of the supporting nutrient medium on the reproduction of the carnivorous plague virus, we tested the SSW, DMEM and Igla nutrient media available in the RIBSP. In order to determine the effect of serum concentration on the reproduction of the carnivorous plague virus in cell cultures, we tested 1, 2, 5 and 10% concentrations of fetal serum of calves in a supportive environment.

Determination of the biological activity of a strain of carnivorous plague virus in tested cultivation systems. To determine the optimal infecting dose of the carnivorous plague virus at which its greatest accumulation occurs, we tested doses of the virus from 0.01 to 1 TCID₅₀/cl. Upon achieving cytopathic effect in the monolayer of cell culture by 85-90%, mattresses were subjected to two cycles of freezing-thawing in the range from minus 40°C to room temperature. The collection of virus-containing materials (VCM) of each passage was carried out under aseptic conditions in sterile vials. At the same time, samples were taken from each vial with VSM to determine the biological activity of the virus in accordance with the method. The virus titer was calculated using the Reed I.J. and Muench H. A method were specified in lg TCID₅₀/cm³ [7]. The sterility of the VCM of each passage was determined according to Interstate Standard 28085-2013 [8].

Statistical processing of the results. All experiments were carried out in three-fold repetition. Statistical processing of experimental data was carried out with the calculation of the arithmetic mean (M) and the mean square error (m) using the computer program "Microsoft Excel" and GraphPad Prism version 8.0.1. Digital data were subjected to statistical analysis with the determination of averages and their errors by the direct and difference method according to the Student.

Results and discussion

Choosing the optimal system for cultivating the carnivorous plague virus

Using the above cell cultures, 6 consecutive passages were carried out. The results of these studies are presented in table 1.

Table 1 - Virus adaptation to different cell cultures

Name of the cell culture	Virus/strain	Passage level					
		1	2	3	4	5	6
lamb kidney	"LD"	+ ---	+ +--	+ ++-	+ +++	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	+ ---	+ +--	+ ++-	+ +++	+ +++	+ +++
calf kidney	"LD"	+ ---	+ +--	+ ++-	+ +++	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	+ ---	+ +--	+ ++-	+ +++	+ +++	+ +++
Vero	"LD"	+ ---	+ ++-	+ +++	+ +++	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	+ ---	+ +--	+ +++	+ +++	+ +++	+ +++
BHK-21	"LD"	- ---	+ ---	+ +++	+ +++	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	+ ---	+ +--	+ +++	+ +++	+ +++	+ +++
kidney of a pig embryo	"LD"	- ---	-- --	-- ++	- +++	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	- ---	+ --	+ +--	+ +++	+ +++	+ +++
IB-RS-2	"LD"	- ---	-- --	+ ---	+ ++-	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	- ---	-- --	+ ---	+ +--	+ +++	+ +++
sheep kidney	"LD"	- ---	-- --	+ ---	+ +--	+ ++-	+ +++
	"Vakchum"	- ---	+ ---	+ +--	+ +++	+ +++	+ +++
Notes:							
1 «+ - - -» – the appearance of cytopathic action by 25%;							
2 «+ + - -» the appearance of cytopathic action by 50%;							
3 «+ + + -» – the appearance of cytopathic action by 75%;							
4 «+ + + +» – the appearance of cytopathic action by 100%;							
5 «- - - -» – absence of cytopathic action.							

As can be seen from the results of Table 1, the carnivorous plague virus adapts to cell cultures of lamb kidney, calf kidney, Vero, BHK-21 and kidney of a pig embryo at the 3rd passage level. The adaptation was longer, at the 4th passage level, to cell cultures of the IB-RS-2 and sheep kidney transplanted line.

In the cultures of the cells of lamb kidney, calf kidney, Vero and BHK-21 the cytopathic action of the virus developed 48-56 hours after infection, the destruction of the monolayer and its detachment from the glass was observed after 72 hours. In cell cultures, the kidney of a pig embryo, IB-RS-2 cytopathic action of the virus developed after 72 hours. Reproduction of the virus was accompanied at first by focal, and later, after 96 hours, almost complete destruction of the cellular monolayer.

Thus, the conducted studies have shown that all tested cell cultures are sensitive to the carnivorous plague virus. It should be noted that a more pronounced and earlier cytopathic action of the carnivorous plague virus is observed in the cell cultures of lamb kidney and Vero. It was also noted that calf kidney and kidney of a pig embryo cell cultures have satisfactory characteristics.

Development of optimal parameters for obtaining active virus-containing material in selected cultivation systems

The results of determining the biological activity of the virus strain in the tested cultivation systems are presented in Table 2.

Table 2 – Biological activity of the carnivorous plague virus in various cell cultures

Name of the cell culture	Number of experiments	Biological activity of viruses in cell culture, lg TCID ₅₀ /cm ³ (M±m)	
		"LD"	"Vakchum"
lamb kidney	3	5,75±0,11	5,31±0,08
calf kidney	3	5,00±0,14	4,73±0,12
Vero	3	6,25±0,11	5,75±0,12
BHK-21	3	5,0±0,07	4,77±0,11
kidney of a pig embryo	3	4,5±0,10	4,43±0,09
sheep kidney	3	4,03±0,09	3,77±0,11

From the data presented in Table 2, it follows that the most acceptable cell culture for determining biological activity is the cell cultures of lamb kidney and Vero. At the same time, the biological activity of the virus is 5.75–6.25 lg TCID₅₀/cm³, respectively.

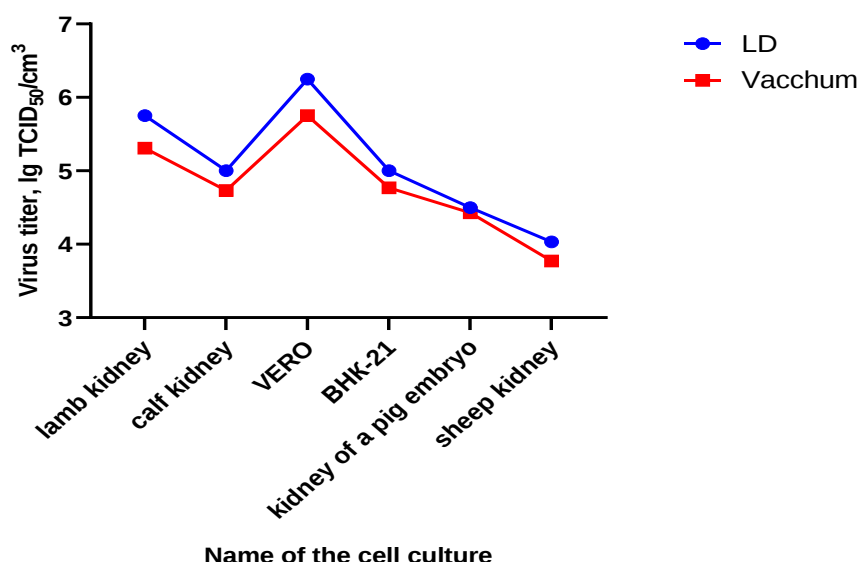


Figure 1 - Biological activity of the carnivorous plague virus in various cell cultures

To determine the optimal infecting dose of the carnivorous plague virus at which its greatest accumulation occurs, we tested doses of the virus from 0.01 to 1 TCID₅₀/cl., which infected the Vero cell culture. The collection of viral raw materials was carried out 72-96 hours after infection.

The biological activity of the viral material was determined by titration of samples in Vero cell culture.

As a result of these studies, it was found that the greatest accumulation of the carnivorous plague virus in cell culture ($6.25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$) occurs at an infecting dose of 0.1–0.5 $\text{TCID}_{50}/\text{cl.}$, and the optimal time for collecting viral material is 96 hours.

To study the effect of the quality of the supporting nutrient medium on the reproduction of the carnivorous plague virus, we tested the SSW, DMEM and Igla nutrient media available in the RIBSP. As a result of the conducted studies, it was found that the nutrient medium of Igla and SSW decreased its pH after 48-72 hours and caused a sharp slowdown in the reproduction of the virus and the necrosis of the monolayer of cells. The DMEM medium did not affect the cell monolayer for 8-10 days and contributed to the reproduction of the carnivorous plague virus in the tested cell cultures after 72-96 hours. The cytopathic effect of the virus on the Vero cell culture is shown in Figure 2.

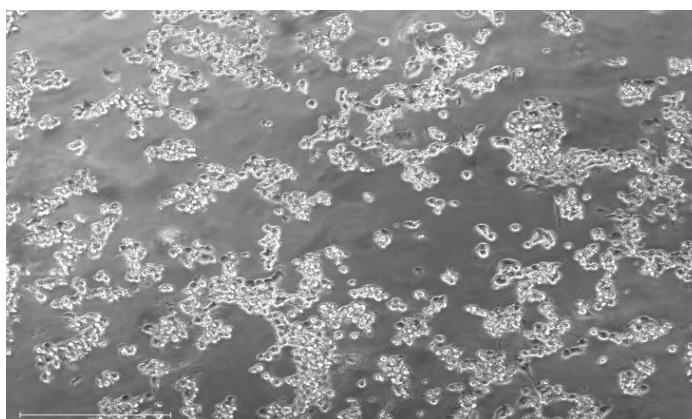


Figure 2 – cytopathic effect of carnivorous plague virus in vero cell culture (magnification x 100).

In order to determine the effect of serum concentration on the reproduction of the carnivorous plague virus in cell cultures, we tested 1, 2, 5 and 10% concentrations of fetal serum of calves in a supportive environment. As a result of the conducted studies, it was found that the 1% serum content did not contribute to the rapid accumulation of the virus, the cytopathic effect of the virus was weak, the destruction of the monolayer did not occur. In further studies, it was determined that the optimal serum concentration was 2%.

Viral diseases of carnivores cause significant damage to fur farming, domestic and service dog breeding. The most dangerous of them is the plague of carnivores. The first outbreaks of these diseases appeared in Asia 3,000 years ago, and then spread to the Middle East, and then to Europe. In Russia, the plague of dogs was first registered in 1762 in the Crimea and called it the "Crimean disease", then in 1770 it was discovered in Moscow [9]. On the territory of the Republic of Kazakhstan, the plague of carnivores is found everywhere. An analysis of the literature shows that this disease has been registered in the country in different years among dogs of various breeds, minks, thorzofredok, arctic foxes, foxes and seals. [10, 11].

The carnivorous plague virus can be adapted to chicken embryos and cultured in them when infected with the chorionallantoid shell. Grayish foci and strands appear in the shell, as a result, the embryos die. Infection of embryos by introducing virus-containing material into the yolk sac leads to their death on the 7th-11th day after infection [12]. From the literature data, we know that the carnivorous plague virus actively reproduces in primary cultures of kidney and lung cells of dogs, ferrets, and the mucous membrane of the bladder of dogs, and adapted strains - in chicken embryo cells and in transplanted cells - MDVK, Vero, etc. [13]. The cytopathic effect of the virus is manifested by the formation of syncytium 7-14 days after infection of the monolayer [14]. After adaptation, the virus can be cultivated on 3-6-month-old ferrets and 6-12-month-old dog puppies.

According to the results of our studies, the carnivorous plague virus is adapted to cell cultures of lamb kidney, calf kidney, Vero, BHK-21, kidney of a pig embryo IB-RS-2 starting from the 3rd passage level, causes cytopathic effect in 48-72 hours. We have recognized the Vero cell culture as the most optimal system for reproduction of the carnivorous plague virus. The cytopathic effect of the virus develops after 48-56 hours, the titer of the virus was $6.25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. The main parameters (infecting dose, serum concentration, nutrient medium) of cultivation of the carnivorous plague virus in Vero cell culture allowing to obtain an active virus-containing suspension have been determined.

In order to determine the effect of serum concentration on the reproduction of the carnivorous plague virus in cell cultures, we tested 1, 2, 5 and 10% concentrations of fetal serum of calves in a supportive environment. As a result of the conducted studies, it was found that the 1% serum content did not contribute to the rapid accumulation of the virus, the cytopathic effect of the virus was weak, the destruction of the monolayer did not occur. In further studies, it was determined that the optimal serum concentration was 2%.

Viral diseases of carnivores cause significant damage to fur farming, domestic and service dog breeding. The most dangerous of them is the plague of carnivores. The first outbreaks of these diseases appeared in Asia 3,000 years ago, and then spread to the Middle East, and then to Europe. In Russia, the plague of dogs was first registered in 1762 in the Crimea and called it the "Crimean disease", then in 1770 it was discovered in Moscow [9]. On the territory of the Republic of Kazakhstan, the plague of carnivores is found everywhere. An analysis of the literature shows that this disease has been registered in the country in different years among dogs of various breeds, minks, thorzofredok, arctic foxes, foxes and seals. [10, 11].

The carnivorous plague virus can be adapted to chicken embryos and cultured in them when infected with the chorionallantoid shell. Grayish foci and strands appear in the shell, as a result, the embryos die. Infection of embryos by introducing virus-containing material into the yolk sac leads to their death on the 7th-11th day after infection [12]. From the literature data, we know that the carnivorous plague virus actively reproduces in primary cultures of kidney and lung cells of dogs, ferrets, and the mucous membrane of the bladder of dogs, and adapted strains - in chicken embryo cells and in transplanted cells - MDVK, Vero, etc. [13]. The cytopathic effect of the virus is manifested by the formation of syncytium 7-14 days after infection of the monolayer [14]. After adaptation, the virus can be cultivated on 3-6-month-old ferrets and 6-12-month-old dog puppies.

According to the results of our studies, the carnivorous plague virus is adapted to cell cultures of lamb kidney, calf kidney, Vero, BHK-21, kidney of a pig embryo IB-RS-2 starting from the 3rd passage level, causes cytopathic effect in 48-72 hours. We have recognized the Vero cell culture as the most optimal system for reproduction of the carnivorous plague virus. The cytopathic effect of the virus develops after 48-56 hours, the titer of the virus was $6.25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. The main parameters (infecting dose, serum concentration, nutrient medium) of cultivation of the carnivorous plague virus in Vero cell culture allowing to obtain an active virus-containing suspension have been determined.

Conclusion

As a result of the conducted studies, optimal systems for cultivating the carnivorous plague virus on cell cultures were determined and the main parameters were determined that allow obtaining a virus-containing suspension of the virus suitable for the production of specific antigens. The results obtained by us coincide with the literature data and complements the information about the optimal conditions for the cultivation of the carnivorous plague virus.

Funding

The work was carried out within the framework of the state task "Biological safety services in the field of science" for targeted funding for 2022 with the support of the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan.

References:

- 1 Bakulin V.A., Kashtanova D.V. (2014) Chuma plotoyadnyh [Canine distemper]. Veterinarnaya klinika. - no 10. - pp. 15 - 17.
- 2 Baumgartner W., Alldinger S., Beineke A., Groters S., et all. Canine distemper virus an agent looking for new hosts. German. – 2003. – Vol. 110. – P. 137-42. PMID: 12756952.
- 3 Vorob'eva A. A. (2003) Atlas po medicinskoj mikrobiologii, virusologii i immunologii [Atlas of Medical Microbiology, Virology and Immunology]. M.: Medicinskoe informacionnoe agentstvo. – 236 p.
- 4 Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. J Virol. – 2013. – Vol. 87. – P. 1105-1114. doi: 10.1128/JVI.02419-12. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23135729.
- 5 Qiu W, Zheng Y, Zhang S, Fan Q, Liu H, Zhang F, Wang W, Liao G, Hu R. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. Emerg Infect Dis. – 2011. – Vol. 17. – P. 1541-1543. doi: 10.3201/eid1708.101153. PMID: 21801646; PMCID: PMC3381540.
- 6 Cleaveland S., Appel M.G., Chalmers W.S., Chillingworth C., Kaare M., Dye C. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. Vet. Microbiol. - 2000. — P. 217–227.
- 7 Reed I.J., Muench H.A. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *American Journal of Hygiene*. – 1938. – 27. – P.493 – 497.
- 8 GOST 28085-2013 Sredstva lekarstvennye biologicheskie dlya veterinarnogo primeneniya. Metody kontrolya steril'nosti.
- 9 Gilbert M., Soutyrina S.V., Seryodkin I.V., Sulikhan N., Uphyrkina O.V., Goncharuk M., Matthews L., Cleaveland S., Miquelle D.G. Canine distemper virus as a threat to wild tigers in Russia and across their range. Integr Zool. - 2015. – Vol. 10. – P. 329-343. doi: 10.1111/1749-4877.12137. PMID: 25939829.
- 10 Koshemetov ZH.K., Kydyrbaev ZH.K., Sultankulova K.T.(2014) Chuma plotoyadnyh ugrazhaet redkim zhivotnym [The plague of carnivores threatens rare animals]. Innovacionnoe razvitie nauki v obespechenii biologicheskoy bezopasnosti. – pp.131-135.
- 11 Orynbaev M. B., Belousov V. YU., Sultankulova K. T., Stochkov V. M., Kerimbaev A. A. (2011) Sekvenirovanie i filogeneticheskij analiz p- i h-genov shtammov virusa chumy plotoyadnyh, vydelennyh na territorii Kazakhstana [Sequencing and phylogenetic analysis of p- and h-genes of canine distemper virus strains isolated in Kazakhstan]. Aktual'nye voprosy veterinarnoj biologii, vol 3, no 11, pp. 11-17.
- 12 Bronnikova T. M. (2017) Harakteristika virusa chumy plotoyadnyh [Characterization of canine distemper virus]. IX Mezhd. Studencheskaya nauchnaya konferenciya. Sochi.
- 13 Syurin V.N. (1979) Chastnaya veterinarnaya virusologiya: ucheb. Posobie [Private veterinary virology].– M.: Kolos, 472 p.
- 14 Martinez-Gutierrez M, Ruiz-Saenz J. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. BMC Vet Res. - 2016. P. 120-126. doi: 10.1186/s12917-016-0702-z.